

0719600-1

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ДЫХАЛ ЮЛИЯ ИВАНОВНА

**ИОНЫ МЕТАЛЛОВ КАК МЕТКИ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОРЕАГЕНТОВ**

02.00.02 - аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань -2000

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Казанского государственного университета

Научные руководители:

академик МАНВШ, член-корр. РАЕН,
доктор химических наук,
профессор Г.К. БУДНИКОВ

доктор химических наук,
профессор Э.П.МЕДЯНЦЕВА

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
профессор Абдуллин И.А.

кандидат химических наук,
Боос Г.А.

Ведущая организация:

Казанский государственный технологический
университет, г. Казань

Защита состоится "27" декабря 2000 г. в 14 часов
на заседании диссертационного Совета К 053.29.02 по
химическим наукам Казанского государственного университета,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, химический факультет,
Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.



Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18, КГУ, научная часть.

Автореферат разослан "25" ноября 2000 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета

кандидат химических наук

Handwritten signature of N.P. Fedotova in black ink, followed by the printed name 'Н.Р. Федотова'.

Актуальность темы. Иммунологические реакции все чаще используются в настоящее время в практике аналитической химии. Это обусловлено их высокой селективностью и чувствительностью при регистрации степени протекания биоспецифических взаимодействий, что достигается при использовании различных меток. Несмотря на существующее многообразие методов иммунохимического анализа (ИХА), постоянно появляются новые варианты, в основном, благодаря использованию новых меток и способов их детекции. Этому способствует также комбинирование и совмещение уже известных аналитических подходов с принципами иммунологии. Привлекательным в этом плане является использование в качестве меток электрохимически активных соединений (металлоорганических, координационных) или непосредственно ионов металлов. Одним из недостатков использования ионов металлов в качестве меток в иммунохимическом анализе является достаточно высокий предел обнаружения при использовании в качестве аналитического сигнала диффузионных токов восстановления ионов металлов. В то же время известно, что в растворах ионов Co(II) , III в присутствии соединений белковой природы в условиях полярографии (вольтамперометрии) наблюдаются каталитические токи выделения водорода (волны Брдычки), которые могут в несколько раз превышать по величине диффузионные токи. Это позволяет предположить, что сочетание таких электрокаталитических реакций с принципами иммунохимического анализа может позволить снизить нижнюю границу определяемых концентраций иммунореактивов, а так же упростить и удешевить анализ.

Цель исследования заключалась в разработке новых вариантов иммунохимического анализа с вольтамперометрическим контролем с использованием волн каталитического выделения водорода в присутствии ионов переходных металлов в качестве меток для оценки биоспецифических взаимодействий.

Научная новизна и практическая значимость. Показана и обоснована возможность использования ионов Co(II) и Ni(II) в качестве меток для иммунохимического анализа некоторых антигенов (Ag). Разработаны новые варианты иммунохимического анализа, отличающихся по способу введения метки в один из компонентов биоспецифического взаимодействия. Для оценки степени протекания иммунных реакций использована способность комплексов белков с ионами Co(II) и Ni(II) вызывать каталитическое выделение водорода. Определено влияние различных факторов (рН и природы буферных растворов, буферной емкости, концентрации иммунореактивов, ионов металла) на величину аналитического сигнала.

Получены нитроцеллюлозные мембраны с иммобилизованными антителами (Ат) против панкреатической рибонуклеазы быка, позволяющие сохранить их способность к иммунохимическим взаимодействиям.

Показана возможность получения конъюгата, включающего исследуемый антиген, бифункциональный хелатообразующий реагент - диэтилентриаминопентауксусную кислоту (ДТПА) и металлическую метку. Найден условия функционирования систем на основе иммобилизованных Ат и конъюгата Аг с металлической меткой, позволяющие регистрировать каталитическую волну выделения водорода.

Предложены новые варианты иммунохимических определений с аналитическими характеристиками, отвечающими требованиям иммуноанализа. Обоснованы подходы, позволяющие предложить разработанные методики для определения рибонуклеазы в биологических жидкостях и вируса крапчатости гвоздики в растительных экстрактах на уровне наномолей.

Разработанные способы анализа основаны на использовании доступных реагентов в качестве метки (ионы металлов) и более просты в исполнении по сравнению, например, с классическим иммуноферментным методом.

На защиту выносятся

- обоснование выбора индикаторной системы иммунореагент - ион металла;
- интерпретация данных об электровосстановлении ионов металлов в присутствии изучаемых антител или антигенов и факторы, определяющие величину аналитического сигнала (рН и природа буферных растворов, буферная емкость, концентрации иммунореагентов и ионов металла);
- совокупность стадий предлагаемых вариантов иммунохимического анализа;
- характеристики конъюгата, включающего исследуемый антиген, бифункциональный хелатообразующий реагент и металлическую метку;
- условия функционирования систем на основе антител, иммобилизованных в нитроцеллюлозные мембраны, антигенов или конъюгатов, включающих антиген и металлическую метку;
- новые методики иммунохимического определения рибонуклеазы.

Работа по теме диссертации выполнялась в соответствии с координационным планом РАН по направлению 2.20.1 (разделы 2.20.2.1 и 2.20.4.7) и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 97-03-33232 и № 00-03--32389).

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
им. И. И. Лебачевского
Иркутского гос. университета

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на II-ой Всероссийской конференции молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" (Саратов, 1999г.), LXXX Поволжской региональной конференции "Физико-химические методы в координационной и аналитической химии" (Казань, 1999г.), 5-ой Всероссийской конференции "Электрохимические методы анализа" (Москва, 1999г.), 8-ой Международной конференции по электроанализу (Бонн, 2000г.), Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов" (Москва, 2000г.), Всероссийской конференции с международным участием "Сенсор 2000. Сенсоры и микросистемы" (Санкт-Петербург, 2000г.)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ. Из них 1 статья и 5 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях, одна статья принята к печати.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 14 рисунков. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, включающего 140 наименований.

В первой главе (литературный обзор) представлена классификация иммунохимических методов анализа, в основу которой положены различные признаки. Аналитические возможности основных вариантов иммуноанализа показаны на примере результатов работ, опубликованных в последнее время. Отмечены основные достоинства и недостатки различных методов, а так же тенденции развития иммунохимического анализа.

Вторая глава литобзора обобщает сведения о каталитическом выделении водорода в растворах комплексных соединений некоторых металлов с органическими лигандами. Рассмотрены факторы, влияющие на величину каталитического эффекта, а так же возможные механизмы этого процесса.

Третья глава содержит постановку задачи, описание объектов исследования и использованные методики проведения эксперимента.

Четвертая глава посвящена выбору индикаторных систем переходный металл - определяемый Ag для разработки новых вариантов иммунохимического анализа. Описано электрохимическое поведение ионов металлов в присутствии изучаемых Ag. Рассмотрено влияние различных факторов на величину аналитического сигнала (рН и природа буферного раствора, буферная емкость, начальный потенциал, концентрации иммуносреагентов и ионов металлов). Установлено, что наблюдаемые процессы могут быть отнесены к каталитическому выделению водорода. Предложено несколько

вариантов введения металлической метки в структуру Ag, на примере рибонуклеазы, позволяющих регистрировать каталитические токи выделения водорода. Подобраны рабочие условия проведения иммуноанализа некоторых Ag.

В пятой главе показаны аналитические возможности нового варианта конкурентного иммунохимического анализа, основанного на использовании специально получаемого конъюгата состава Ag- ангидрид ДТПА- ионы металла. Описаны условия получения конъюгата рибонуклеаза-ангидрид ДТПА- ионы Co(II), определено соотношение компонентов в нем. и концентрация металла. Подобраны условия отщепления металлической метки, позволяющие сохранить свойства рибонуклеазы и регистрировать каталитические токи выделения водорода на заключительной стадии иммуноанализа. Предложена методика определения рибонуклеазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальная часть работы выполнена на осциллографическом полярографе ПО-5122(ЦПА) модели 03 с ячейкой, термостатированной при $(25 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, с помощью термостата ТС-50. Рабочим электродом служил стационарный ртутно-пленочный электрод с серебряной подложкой, электрод сравнения - насыщенный каломельный. Объекты исследования: *Рибонуклеаза (РНКаза)*, *Carration mottle virus (CarMV)*, *Phoma Betae (PhB)*, *Candida albicans (CA)*, *Trichophyton rubrum (TrR)* и соответствующие Ат против них. В качестве металлической метки применяли ионы Co(II), Ni(II), Cr(III) и Fe(III). Для введения метки в иммунореагент использовали ДТПА. Для иммобилизации Ат использовали нитрат целлюлозы. типа коллоксилин. Применяли буферные растворы: глицин - HCl, ацетатный, цитратный, фосфатный, трис - HCl, боратный, аммиачный, охватывающие диапазон pH 2.2-10.0.

ВЫБОР ИНДИКАТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ.

Электрохимическое поведение систем: ион переходного металла - иммунореагент. Для разработки нового варианта ИХА с использованием ионов металлов в качестве метки необходимо было выбрать систему ион переходного металла - иммунореагент (антитело или антиген), позволяющую оценить изменение концентраций определяемых компонентов биоспецифического взаимодействия. С этой целью проведена оценка возможности использования ионов Co(II), Ni(II), Cr(III) и Fe(III) в качестве меток для анализа Ag *Candida albicans*, *Phoma Betae*,

Trichophyton rubrum, *Carnation mottle virus*, Рибонуклеазы или соответствующих Аг против них. Для этого регистрировали величину диффузионного катодного тока восстановления ионов металлов и ее изменение на фоне буферных растворов различной природы в широком диапазоне pH (2.2-10.0) в отсутствие и в присутствии антигена и иммобилизованных или нативных антител. В зависимости от природы изучаемого Аг, иона металла, природы и pH используемого буферного раствора, в некоторых случаях наблюдалось изменение тока при потенциалах, соответствующих восстановлению используемых ионов металлов ($E_{\text{пика}} = -1.4\text{В}$ для Co(II) и $E_{\text{пика}} = -1.1\text{В}$ для Ni(II)).

На вольтамперограммах растворов, содержащих ионы Co(II) или Ni(II) на фоне трис- HCl и аммиачного буферных растворов в присутствии изучаемых Аг наблюдается необратимая волна, превышающая по величине уровень диффузионного тока, отвечающего восстановлению соответствующих ионов. Кроме того, пик превращается в волну (рис.1), что указывает на изменение характера электродного процесса.

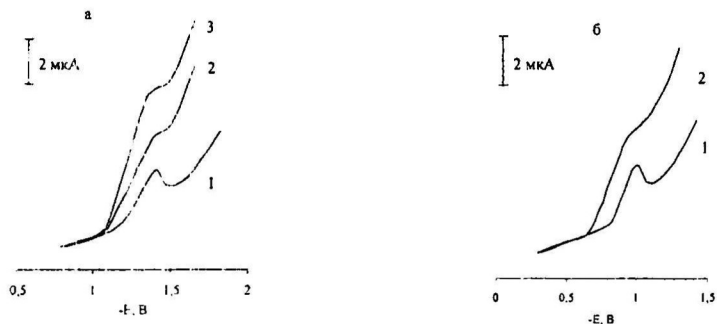


Рис 1. Вольтамперограммы растворов Co(II) с $C=5 \times 10^{-4}\text{М}$ на фоне трис- HCl буфера с pH 7.5 (а) и Ni(II) с $C=5 \times 10^{-4}\text{М}$ на фоне аммиачного буфера с pH 9.5(б) в отсутствие (кривые 1а,1б) и в присутствии Аг *CArMV* (кривая 2а) и Аг *PHKазы* (кривые 3а,2б) в концентрациях 0.02 мг/мл. $V=1\text{В/с}$, $t_{\text{ад}}=2\text{с}$.

Проведенные исследования показали, что изменение тока происходило в следующих условиях:

1). В присутствии Аг *PHKазы* в растворе соли Co(II) на фоне фосфатного, трис- HCl , боратного и аммиачного буферных растворов при $E=-1.4\text{В}$, а также в растворе Ni(II) в трис- HCl , боратном и аммиачном буферных растворах при $E=-1.0 \div -1.1\text{В}$;

- 2). В присутствии Ag *PhB* в растворе Co(II) на фоне трис-HCl и аммиачного буферных растворов, а так же в растворе соли Ni(II) в трис-HCl буфере;
- 3). В присутствии Ag *TrR* в растворе Co(II) в трис-HCl и боратном буферных растворах.
- 4). В присутствии Ag *CarMV* в растворе соли Co(II) на фоне фосфатного, трис-HCl, боратного и аммиачного буферных растворов, а также в растворе Ni(II) в трис-HCl, боратном и аммиачном буферных растворах.

Наибольшее увеличение тока в изученных системах наблюдалось при добавлении Ag *PHКазы*, Ag *PhB* и Ag *CMV* в раствор трис-HCl буфера, содержащего ионы Co(II) (рис.1а).

При использовании растворов Ni(II) этот эффект меньше по величине по сравнению с системами, содержащими ионы Co(II) (рис.1б), поэтому наибольшее внимание было уделено использованию ионов Co(II) в качестве метки.

При этом меняются и некоторые электрохимические характеристики. Если для диффузионных токов коэффициент Семерано $\Delta \lg i / \Delta \lg V$ составляет 0.55-0.60, то в присутствии Ag *PHКазы* его величина составляет уже 0.3-0.32, а в присутствии Ag *CarMV* - 0.18-0.2 (в различных буферных растворах), что указывает на кинетическую природу электрохимических реакций.

Влияние некоторых факторов на процессы электровосстановления ионов Co(II) и Ni(II) в присутствии белков Установлено, что на изменение величины тока в изученных системах влияют, в частности, pH и буферная емкость раствора.

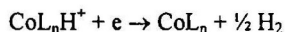
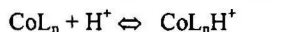
В присутствии *PHКазы* в растворе Co(II) на фоне трис- HCl буфера в области pH от 6.8 до 9.0 наблюдалась колоколообразная зависимость с максимумом при pH 7.5, а для *PhB* - максимальное увеличение тока происходило при pH 8.0

Кривая зависимости тока (I , мкА) от буферной емкости (β) выходит на предел в аммиачном буфере при $\beta=0.5$ и в трис-HCl буфере при $\beta=0.2$ в растворе ионов Co(II) в присутствии Ag *PHКазы*.

Такие зависимости характерны для процессов, связанных с участием ионов водорода в электродных реакциях. К их числу относится и процесс каталитического выделения водорода. На каталитическое выделение водорода указывает и выделение пузырьков водорода при электролизе при потенциалах наблюдаемых волн.

Каталитическое выделение водорода может быть обусловлено возможностью образования комплексов между ионами металлов и исследуемыми соединениями белковой природы (Ag). Поскольку на вольтамперограммах отсутствует волна

восстановления комплекса Co(II) с Ag до комплекса Co(0) , механизм каталитического выделения водорода можно представить следующей схемой:



где L - соединение белковой природы (At или Ag).

Величина волн каталитического выделения водорода зависит как от концентрации Ag (при постоянной концентрации ионов Co(II)), так и от концентрации ионов металла (при постоянной концентрации Ag) (рис.2,3).

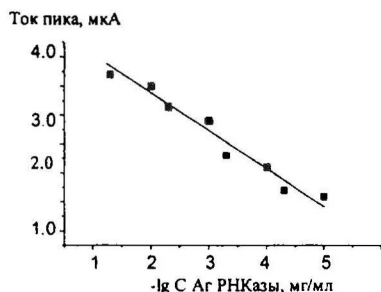


Рис.2 Зависимость величины тока от концентрации Ag РНКазы в растворе ионов Co(II) с $C=5 \times 10^{-4} \text{M}$ на фоне трис- HCl буфера с $\text{pH } 7.5$.

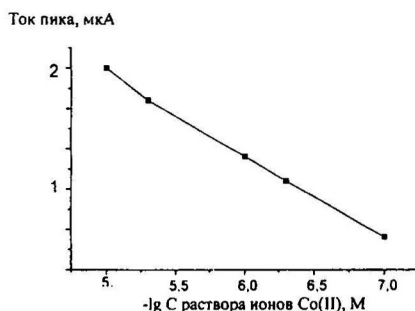


Рис.3 Зависимость каталитического тока выделения водорода от концентрации ионов Co(II) в присутствии 0.02 мг/мл Ag РНКазы в трис- HCl буфере с $\text{pH } 7.5$.

Иммунохимическое определение рибонуклеазы. Проведенные исследования послужили основой для разработки нового варианта иммунохимического определения антигенов, обладающих способностью вызывать каталитическое выделение водорода в растворах ионов Co(II) . Поскольку гетерогенные варианты ИХА всегда предполагают наличие одного из компонентов биоспецифического взаимодействия в иммобилизованном виде, изучаемые At иммобилизовали в НЦ мембрану.

Иммунохимическое определение предполагает проведение четырех последовательных стадий анализа:

- образование иммунного комплекса At-Ag в среде трис- HCl буфера с $\text{pH } 7.5$ (или аммиачного буфера) на поверхности НЦ мембран, содержащих иммобилизованные At , в течении 15 мин;

- удаление несвязавшегося Аг трис-НСІ (или аммиачный) буфером;
- разрушение иммунного комплекса в среде глицин-НСІ буферного раствора с рН 2.2 (или ацетатного буфера с рН 4.5) в течении 10 сек;
- нейтрализация 1М раствором аммиачного буфера до рН 7.2-7.7;
- электрохимическое детектирование металлической метки (определение концентрации Аг).

Первую стадию ИХА проводили в нескольких вариантах, варьируя условия образования иммунного комплекса (рН и природу буферного раствора, время инкубации, концентрации компонентов) и меняя порядок сливания реагентов. Ионы кобальта вводили или на стадии образования иммунного комплекса или на заключительной стадии анализа для регистрации аналитического сигнала. Для введения метки на стадии образования ИК использовали ДТПА. Некоторые из полученных результатов приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Иммунохимическое определение Аг РНКазы с использованием ионов Co(II) в качестве метки в присутствии иммобилизованных Ат в разведении 1:5.

$n=5$, $p=0.95$

Вариант анализа	Введено РНКазы, мг/мл	Найдено РНКазы, мг/мл	S_r
а*	2×10^{-3}	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	0.13
	2×10^{-4}	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.15
	4×10^{-5}	$(3.8 \pm 0.8) \times 10^{-5}$	0.20
б**	2×10^{-3}	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.08
	2×10^{-4}	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.12
	2×10^{-5}	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.14
	4×10^{-5}	$(3.7 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	0.16
	4×10^{-6}	$(3.7 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	0.21

а* - при введении ионов Co(II) на первой стадии анализа

б** - при введении ионов Co(II) в реакционную среду после разрушения иммунного комплекса

Данные таблицы показывают, что при введении метки на заключительной стадии анализа достигается большая чувствительность определений с меньшей погрешностью: $c_{\text{н РНКазы}} = 2 \times 10^{-6}$ мг/мл (при $C_{\text{Co(II)}} = 5 \times 10^{-4}$ М); $c_{\text{н Co(II)}} = 5 \times 10^{-8}$ М

(при $C_{\text{РНКазы}} = 2 \times 10^{-2}$ мг/мл), а при введении метки на стадии образования иммунного комплекса $C_{\text{и РНКазы}} = 6 \times 10^{-6}$ мг/мл (при $C_{\text{Co(II)}} = 5 \times 10^{-4}$ М) и $C_{\text{и Co(II)}} = 5 \times 10^{-7}$ М (при $C_{\text{РНКазы}} = 2 \times 10^{-2}$ мг/мл).

Способность Аг *PhB* и *CarMV* вызывать каталитическое выделение водорода в присутствии солей Co(II) также позволяет предложить для их определения варианты иммунохимического анализа с использованием ионов Co(II) в качестве метки. Результаты определения представлены в табл.2.

Некоторые аналитические характеристики разработанного неконкурентного варианта иммунохимического определения РНКазы, *PhB* и *CarMV* представлены в табл.3.

Таблица 2.

Результаты определения *CarMV* и *PhB* с использованием ионов Co(II) с $C = 5 \times 10^{-4}$ М в качестве метки.
 $n=4$, $p=0.95$.

	Определяемый Аг	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S_r
1	<i>CarMV</i>	2.0	2.2 ± 0.2	0.09
		1.5	1.4 ± 0.2	0.13
		1.0	1.1 ± 0.2	0.18
		0.5	0.5 ± 0.1	0.19
		0.1	0.11 ± 0.03	0.27
2	<i>PhB</i>	0.06	0.065 ± 0.005	0.07
		0.04	0.045 ± 0.005	0.09
		0.03	0.025 ± 0.003	0.11
		0.02	0.025 ± 0.004	0.16
		0.01	0.020 ± 0.005	0.23

1 - в среде аммиачного буфера с pH 9.5;

2 - в среде трис-HCl буфера с pH 7.5;

КОНКУРЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ИОНЫ МЕТАЛЛА

Для разработки конкурентного варианта иммуноанализа специально получали конъюгат, включающий металлическую метку, состава иммунореагент - ангидрид ДТПА- ион металла. Молекула ДТПА способна взаимодействовать с белковой молекулой с образованием слабых ионных связей. Однако для получения прочных и стабильных конъюгатов этого недостаточно.

Таблица 3

Аналитические характеристики для определения концентраций *Ag CA₁ MV*, *PhB* и *PHКаза*

Антиген	Динамический диапазон концентраций, мг/мл	Уравнение градуировочного графика $I_p = a \times C_{Ag} + b, r$		
		a	b	r
<i>CarMV</i>	0.5-2.0	0.97 ± 0.04	3.01 ± 0.05	0.9971
<i>PhB</i>	0.01-0.06	5.6 ± 0.2	2.50 ± 0.08	0.9899
<i>PHКаза</i>	$2 \times 10^{-2} - 4 \times 10^{-6}$	8.9 ± 0.9	2.3 ± 0.1	0.9878

Для этой цели использовали ангидрид ДТПА. При взаимодействии такого ангидрида с молекулой белка происходит реакция нуклеофильного присоединения предпочтительно по $-NH_2$ (возможно и по $-SH$ или $-OH$) группам аминокислотных остатков протеина.

При введении максимального количества метки в конъюгат варьировали соотношение и время контакта компонентов при получении конъюгата. По изменению поглощения при $\lambda=260$ нм было установлено, что для присоединения максимального количества молекул ангидрида ДТПА к молекуле *PHКаза* достаточно 60 мин.

Для удаления несвязавшихся или избыточных молекул ангидрида ДТПА проводили диализ в слабокислой среде цитратного буфера с pH 5.5.

При введении ионов $Co(II)$ в модифицированный ангидридом ДТПА белок, варьировали концентрацию металлической метки в области $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-3} M$. Раствор кобальта добавляли к модифицированной ангидридом ДТПА *PHКаза* и выдерживали в течение часа при комнатной температуре. Для удаления несвязавшихся или неспецифично адсорбированных ионов $Co(II)$ также проводили диализ в слабокислой среде.

Для оценки количества металлической метки, которое связывается с одной молекулой белка, к полученному конъюгату *PHКаза*- ангидрид ДТПА $-Co(II)$ добавляли хлористоводородную кислоту с различной концентрацией (0.01-1M) и после нейтрализации среды до pH 7.8-8.0 определяли концентрацию металла по каталитическим волнам выделения водорода. Степень отщепления металлической метки от конъюгата зависит от концентрации кислоты (рис.2). При использовании 1M раствора хлористоводородной кислоты процент отщепления металлической метки от конъюгата около 90%.

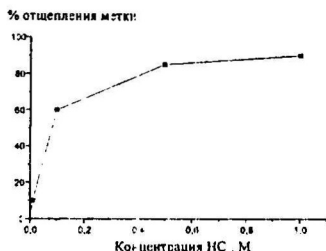


Рис.4 Эффективность отщепления ионов Co(II) от конъюгата в зависимости от концентрации используемой хлористоводородной кислоты

Максимальная концентрация металла в конъюгате составила $5 \times 10^{-6} \text{ М}$. Концентрацию металла, в данном случае Co(II) , определяли вольтамперометрически при $E = -1.4 \text{ В}$ в растворе, содержащем Ag PHКазы . Соотношение ионов Co(II) к молекуле PHКазы в полученном конъюгате составило 6:1. Реакция преципитации показала, что Ag при этом сохраняет свои иммунологические свойства и образует иммунные комплексы с соответствующими Ат .

Предлагаемый вариант конкурентного иммуноанализа предполагает проведение следующих стадий:

- получение конъюгата состава: $\text{PHКаза- ангидрид ДТПА- Co(II)}$ и определение молярного соотношения компонентов в нем;
- образование иммунного комплекса Ат-Ag в среде трис- HCl буфера на поверхности нитроцеллюлозных мембран с иммобилизованными Ат в течении 25 мин;
- удаление несвязавшегося Ag и конъюгата с металлической меткой в среде трис- HCl буфера;
- разрушение иммунных комплексов и отщепление металлической метки под действием 1 М HCl в течении 10 сек;
- нейтрализация среды 1 М раствором трис или аммиака до $\text{pH } 7.2-7.7$;
- регистрация аналитического сигнала и определение Ag .

Основное отличие от предложенного неконкурентного варианта иммуноанализа состоит в получении конъюгата, содержащего металлическую метку и использовании его на первой стадии анализа.

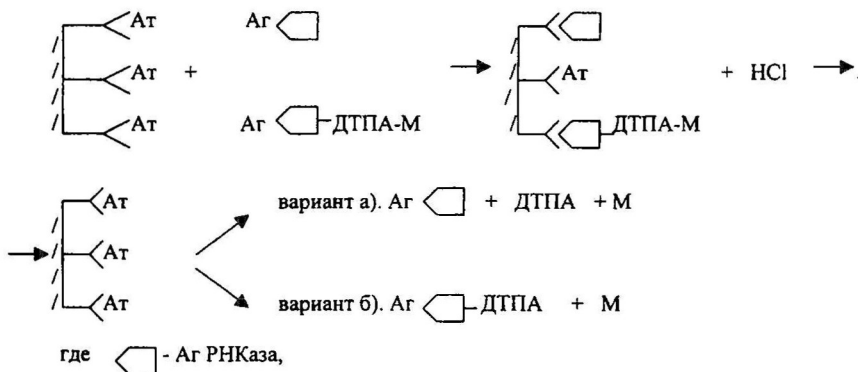
Обязательным процессом любого конкурентного иммуноанализа является конкуренция меченых и немеченых Аг за ограниченное число связывающих центров Ат . При постоянно i концентрации меченого Аг добавляли в раствор определенное количество немеченого Аг с известной концентрацией. Область исследуемых концентраций Аг в модельных растворах составляла $2 \times 10^{-2} - 2 \times 10^{-6} \text{ мг/мл}$.

Разрушение иммунокомплексов и отщепление металлической метки является определяющей стадией в предлагаемом варианте иммуноанализа. Отщепление Co(II) от конъюгата в составе иммунного комплекса проводили как описано выше (см. рис.2). В этих условиях, очевидно, происходит не только отщепление метки, но и разрушение иммунокомплекса (возможно при использовании уже 0.02M раствора хлористоводородной кислоты).

В конкурентном иммуноанализе с использованием ионов металлов в качестве метки количество Аг (или Ат) пропорционально количеству отщепившейся метки. Необходимая для ИХА чувствительность определения достигается в предлагаемом варианте путем использования способности РНКазы вызывать каталитическое выделение водорода в присутствии ионов Co(II) , что было доказано предварительными исследованиями.

После разрушения иммунных комплексов Ат- Аг РНКазы в растворе могут присутствовать ионы Co(II) , молекулы немеченого Аг и молекулы Аг, модифицированного ангидридом ДТПА. Оказалось, что не только Аг РНКазы, но и модифицированный белок проявляет способность вызывать каталитическое выделение водорода в присутствии ионов Co(II) . Так как в случае данного варианта иммуноанализа суммарная концентрация меченого и немеченого Аг остается постоянной, а концентрация отщепившейся металлической метки изменяется обратно пропорционально количеству немеченого Аг, возможно определение содержания Аг в растворе, регистрируя волну каталитического выделения водорода. Зависимость тока пика от концентрации раствора РНКазы выражается уравнением $y = (3.0 \pm 0.2) + ((-4 \pm 1) \times 10^{-7})x$, $r = 0.9902$.

Общая схема предлагаемого конкурентного варианта иммуноанализа может быть представлена следующим образом:



◻ – Ag РНКазы, модифицированный ангидридом ДТПА

M - ионы Co(II)

Проведенные исследования позволяют предложить новый вариант конкурентного иммуноанализа для определения некоторых Ag, способных вызывать каталитическое выделение водорода в присутствии ионов переходных металлов. Такая возможность показана на примере иммунной пары Ag-Ag РНКазы с использованием специально полученного конъюгата, содержащего ионы Co(II). Результаты определения РНКазы представлены в табл.4.

Таблица 4.

Иммунохимическое определение Ag РНКазы с использованием конъюгата, содержащего Co(II) в качестве метки с $C=5 \times 10^{-6} M$ в присутствии иммобилизованных Ат в разведении 1:5.
 $n=5$, $p=0.95$

ВВЕДЕНО РНКазы, мг/мл	НАЙДЕНО РНКазы, мг/мл	S_r
2×10^{-2}	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	0.09
2×10^{-3}	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	0.12
2×10^{-4}	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.14
2×10^{-5}	$(2.0 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	0.20

Диапазон определяемых концентраций РНКазы составил $2 \times 10^{-2} - 2 \times 10^{-5}$ мг/мл с $c_n = 4 \times 10^{-6}$ мг/мл.

Таким образом, предложено два варианта иммунохимического анализа - неконкурентный и конкурентный - для определения некоторых антигенов. Одно из преимуществ предлагаемых вариантов состоит в отсутствии необходимости удалять белок из сферы реакции. Напротив, его присутствие позволяет регистрировать аналитический сигнал с чувствительностью, удовлетворяющей требованиям иммунохимического анализа, благодаря использованию наблюдающихся каталитических токов выделения водорода. К преимуществам предлагаемых вариантов также следует отнести применение доступных реагентов в качестве меток и упрощение отдельных стадий анализа.

ВЫВОДЫ

1. Предложены новые варианты иммунохимического анализа некоторых антигенов. Обоснован выбор индикаторных систем иммунореагент - ион переходного металла -

буферный раствор, позволяющих регистрировать каталитические токи выделения водорода.

2. Каталитический эффект наблюдается в присутствии в растворах ионов Co(II) и Ni(II) антигенов РНКазы, CaMV и PhV на фоне аммиачного буфера с pH 9.5-10.0 и трис- HCl буфера с pH 7.2-7.8. Каталитическое выделение водорода обнаружено также в растворе ионов Co(II) в присутствии нативных Ag против PhV в области концентраций от 5×10^{-2} до 5×10^{-11} мг/мл. Максимальный каталитический эффект наблюдается в среде трис- HCl буфера с pH 7.5 и $\beta=0.2$ при концентрации ионов Co(II) 5×10^{-4} М в присутствии РНКазы и PhV , а так же в аммиачном буфере с pH 9.5 и $\beta=0.5$ в присутствии CaMV .

3. Разработан способ иммобилизации антител против РНКазы, путем включения в пленку из нитроцеллюлозы, позволяющий сохранить их способность к иммунохимическим взаимодействиям в течение месяца.

4. Предложен вариант иммунохимического анализа для определения РНКазы с использованием ионов Co(II) в качестве метки. Наибольшая чувствительность анализа реализуется при введении металлической метки на стадии регистрации аналитического сигнала, что позволяет определять РНКазу в области концентраций 2×10^{-2} - 4×10^{-5} мг/мл с $c_n = 4 \times 10^{-6}$ мг/мл; CaMV в интервале 0.5-2.0 мг/мл и PhV в диапазоне 0.01-0.06 мг/мл.

5. Разработан конкурентный вариант ИХА, основанный на использовании специально полученного конъюгата состава РНКазы- ангидрид ДТПА-ион Co(II) . Максимальное соотношение Co(II) : белок составляет 6:1. При этом модифицированный Ag сохраняет свои иммунологические свойства.

6. Наиболее полное отщепление металлической метки (85-90%) от конъюгата достигается при использовании 1М HCl или глицин- HCl буферного раствора с pH 2.2, при этом РНКазы сохраняет способность участвовать в реакции каталитического выделения водорода.

7. Найдены рабочие условия проведения конкурентного иммуноанализа РНКазы, позволяющие регистрировать металлическую метку на заключительной стадии анализа. Предложена методика определения Ag РНКазы в области концентраций 2×10^{-2} - 2×10^{-5} мг/мл с $c_n = 4 \times 10^{-6}$ мг/мл.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Бормотова Ю.И., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Электрохимический контроль иммунологических реакций для определения патогенных грибов и бактерий//

- Международная конференция по аналитической химии: тез. докл. - Алматы, 1998. - С.69
2. Бормотова Ю.И., Лавриненко Е.В. Вольтамперометрический контроль иммунологических реакций для определения патогенных грибов// II-ая Всероссийская конференция молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии": тез. докл. - Саратов, Россия, 1999. - С.175
 3. Бормотова Ю.И., Медянцева Э.П., Калачева Н.В., Будников Г.К. Использование каталитических волн выделения водорода для оценки степени биоспецифических взаимодействий// LXXX-ая Поволжская региональная конференция "Физико-химические методы в координационной и аналитической химии": тез. докл. - Казань, Россия, 1999. - С.85
 4. Бормотова Ю.И., Медянцева Э.П., Калачева Н.В., Будников Г.К. Использование электрокаталитических процессов для контроля иммунологических реакций// 5-ая Всероссийская конференция "Электрохимические методы анализа (ЭМА-99)": тез. докл. - Москва, Россия, 1999. - С.18-19
 5. Dykhal Y.I., Medyantseva E.P., Kalacheva N.V., Budnikov H.K. Catalytic waves of hydrogen in voltammetric control of immunoreactions//8 -th International Conference on Electroanalysis: proceeding abstracts. - Bonn, Germany, 2000. - P.F41
 6. Дыхал Ю.И., Муртазина Н.Р., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Аналитические возможности ионов Co(II) как метки в иммунохимическом анализе//Всероссийская конференция с международным участием "Сенсор 2000. Сенсоры и микросистемы": тез. докл. - Санкт-Петербург, Россия, 2000г. - С.96
 7. Дыхал Ю.И., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Применение электрокаталитических реакций в иммуноанализе рибонуклеазы и вируса крапчатости гвоздики//Сб. научных трудов "Электрохимические, оптические и кинетические методы в химии". - Казань: Изд-во КГУ, 2000г. - С.127-134
 8. Использование ионов металлов для оценки биоспецифических взаимодействий /Дыхал Ю.И., Медянцева Э.П., Муртазина Н.Р., Сафина Г.Р., Будников Г.К., Калачева Н.В.//Журн.аналит.химии. - 2000г. (в печати).

Издательство «Экоцентр»
Без объявл. – 2000
Лицензия № 0307 от 8.06.2000

Бумага офсет № 1. Формат 60*84 1/16. Печать RISO
Объем 1,06 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 18.

Отпечатано с готового оригинал-макета
на полиграфическом участке издательства «Эксцентр»,
г. Казань, ул. К. Маркса, 70.

2-00